نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، ص. ۳۵۴-۳۴۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.3, Fall 2021, P. 341-354
ISSN: 2008 - 4730

مقاله پژوهشی

تولید گیاهان خودریشه گلابی رقم 'نطنز' (*Pyrus communis* L. cv. Natanz) در شرایط درون‌شیشه‌ای

غلامحسین داوری نژاد[1]*- ساجده کریم پور[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۸

چکیده

به منظور تولید درختان خودریشه گلابی رقم 'نطنز' (*Pyrus communis* cv. Natanz) در شرایط درون شیشه‌ای سه آزمایش جداگانه برای بهبود پرآوری شاخه (تاثیرات BAP و Fe-NaEDDHA)، استقرار مریستم (تاثیرات BAP و GA_3) و ریشه‌دهی ریزشاخه‌ها (تاثیرات IBA و NAA) در قالب طرح کاملاً تصادفی به اجرا در آمد. شاخه‌ها در محیط کشت PMI (MS ×1.5 $CaCl_2$. $2H_2O$, KH_2PO_4 and $MgSO_4$. $7H_2O$) حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و صفر میلی‌گرم بر لیتر Fe-NaEDDHA پرآوری شدند (۵/۵۰ شاخه/ریزنمونه) و رشد طولی خوبی داشتند در صورتی‌که غلظت‌های پایین BAP و Fe-NaEDDHA برگ‌های بالغ بیشتری را تولید کرد. محیط کشت PMI غنی شده با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP بعلاوه ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-NaEDDHA برای پرآوری شاخه نطنز بدلیل بالاترین میزان در رشد رویشی و بالاترین کیفیت شاخه‌های پرآوری شده پیشنهاد می‌شود. محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 و یا ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP (۸۱ درصد) و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 (۶۳ درصد) به ترتیب بالاترین درصد استقرار مریستم را داشتند. ریزشاخه‌های درون شیشه‌ای نطنز از طریق فروبری سریع در محلول IBA+NAA (۱۰۰۰+۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و سپس قرار دادن در محیط کشت PMI ریشه‌دار شدند.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، ریشه‌دهی، کشت مریستم، Fe-NaEDDHA

مقدمه

گلابی 'نطنز' یکی از مهم‌ترین ارقام تجاری گلابی در ایران است که به‌دلیل خصوصیات کیفی و کمی بی‌نظیر میوه و هم‌چنین خصوصیات انبارداری مناسب آن مورد توجه است. گیاهان خودریشه گلابی خصوصیات بهتری از قبیل قدرت رشدی زیاد در مقایسه با درختان پیوند شده برروی پایه کوئینز و سطوح پایین خسارات و تلفات ناشی از آفات (۳۷ و ۳۸) نسبت به گیاهان پیوندی دارد. این خصوصیات به احتمال بسیار زیادی آن‌را برای کشت‌های ارگانیک مناسب می‌کند. از طرف دیگر، بدلیل بازدارنده‌های درونی، ریشه‌دار شدن گلابی نطنز موفق نبوده‌است و در بسیاری از موارد قلمه‌های ریشه‌دار شده بدلیل قهوه‌ای شدن از بین رفته‌اند (۵۹). ریزازدیادی بطور قدرتمندی می‌تواند بر این مشکلات غلبه کند.

کشت مریستم گلابی بطور وسیعی با اهداف ریزازدیادی (۱۶ و ۳۶)، حفظ درون‌شیشه‌ای ژرم پلاسم (۶، ۳۰، ۳۶، ۴۵ و ۴۷) و حذف ویروس (۷، ۱۰، ۲۱، ۳۴، ۳۵، ۵۵ و ۶۳) مورد مطالعه قرار گرفته است. چندین فاکتور درونی و بیرونی از قبیل ترکیبات محیط کشت، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، سایز ریزنمونه، بازدارنده‌های داخلی، شرایط محیطی و غیره وجود دارد که منجر به موفقیت و یا عدم موفقیت استقرار مریستم می‌شود. بطور کلی نیاز است محیط کشت پایه با تنظیم کننده‌های رشدی مانند اکسین، سایتوکینین و/یا جیبرلین برای نمو بهینه نوک مریستم غنی‌سازی شود. نوع تنظیم کننده رشد گیاهی و غلظت آن‌ها بستگی به سایز ریزنمونه، گونه گیاهی و، همچنین ممکن است به فصل جداسازی نوک مریستم داشته باشد. مریستم‌های بزرگتر از ۵۰۰ میکرومتر ممکن است حتی در صورت فقدان تنظیم

۱ و ۲- به‌ترتیب استاد و فارغ‌التحصیل دکتری، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: davarynej@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/jhs.2021.60797.0

کننده‌های رشـد کاملاً نمو پیدا کنند (۱۷)، اما بطور کلی اضافه کردن مقادیر پایینی (۰/۵-۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) اکسـین یا سـایتوکینین و یا هر دو مطلوب اسـت. جیبرلین کالوس‌زایی از نوک مریستم را سرکوب می‌کند و برای رشـد و همچنین تمایز بهتر مفید اسـت. سـایتوکنین‌ها تاثیرات مثبتی را در ترکیب با اکسـین‌ها (۵۵) و جیبرلین‌ها در کشـت مریسـتم گونه‌های گلابی (۱۲) داشـتـه‌اسـت. آهن یک جزء حیاتی آنزیمی اسـت کـه در انتقال الکترون، واکنش احیا-اکسـیداسـیون بوسـیله‌ی اکسـیداسـیون از فرم Fe^{2+} به فرم Fe^{3+} شـرکت دارد، همچنین آهن یک جز تشکیل دهنده پروتئین‌های غیر-هِمی ست که در فتوسـنتز، تنفس و تثبیت N_2 مورد نیاز اسـت (۵۴). بسـیاری از مطالعات تاثیر منابع آهن و تاثیر مثبت Fe-NaEDDHA در کشـت درون‌شـیشـه درختان میوه را گزارش کرده‌اند. Fe-NaEDDHA با یا بدون منبع NaEDTA نتایج بهتری را در کشت های درون شیشه‌ای بـلـوبـری (۱۴ و ۸۵) نشـان دادنـد. ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-NaEDDHA بعلاوه ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر تیـامین برای ریشـه‌دهی پایه تترا (*Prunus empyrean* 3) بسـیار موثر بود (۴۱). تعداد شـاخه پرآوری شـده، طول شاخه، و وزن تر شاخه بطور معنی‌داری بوسیله‌ی Fe-NaEDDHA در پـایـه گلابی OHF 333 بهبود یـافـت (۴۹). حقگوتبلوندی و همکاران (۱۶) تاثیرات مثبت Fe-NaEDDHA (۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر ریشـه‌دهی پـایـه‌هـای هیبریدی سـیب ایرانی (AZ×M9) بـه همراه ۲/۴ میلی‌گرم بر لیتر تیـامین گزارش کردند. از آنجایی‌که گلابی متعلق به درختان میوه سـخت ریشـه‌زا هستند شاید مرحله ریشـه‌دهی مهمترین مرحله، حتی مشکل‌ترین مرحله در فرآیند ازدیاد درون‌شـیشه‌ای باشد. ریشه‌دهی درون‌شیشه‌ای ریزقلمه‌ها تحت تاثیر ژنوتیپ (رقم) (۴۶)، نوع و غلظت اکسـین (۲ و ۴۶)، روش القا و بیان ریشه‌دهی (۳، ۷، ۱۳ و ۴۰)، استفاده از مواد محرک مانند PVP، پلی‌آمین‌ها، PP333 (۱۳، ۲۹ و ۳۹) و غیره قرار دارد.

در راسـتای بهبود ازدیاد درون شـیشه‌ای گلابی رقم نطنز تاثیرات متقابل BAP × Fe-NaEDDHA بر پرآوری شـاخه، تاثیرات متقابل غلظت GA_3 × BAP بر اسـتقرار مریسـتم و همچنین اثرات IBA و NAA بر ریشه‌دهی ریزشاخه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرآوری شـاخه (آزمایش اول) و کشـت مریسـتم (آزمایش

جوانه‌های رویشـی شـاخه‌های فصل جاری گلابی رقم 'نطنز' از کلکسـیون گلابی مرکز تحقیقات کشـاورزی و منابع طبیعی اسـتان سـمنان، شـهر شـاهرود (۲۵/۳۶ درجه شرقی، ۵۸/۵۴ درجه شمالی و ارتفاع ۱۳۸۰ متر) جمع‌آوری و سـریعاً در شـرایط خنک به آزمایشـگاه کشـت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شدند. جوانه‌ها بعد از ضـدعفونی سطحی با اتانول ۷۰ درصد برای یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم (NaClO) ۲ درصد برای ۲۰ دقیقه، سه بار با آب مقطر اسـتریل شـسـتشو داده شدند و در محیط کشت PMI حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP مسـتقر شـدند. شـاخه‌های جدید رشد یافته از جوانه‌های فعال شده بعد از ۴ هفته به محیط کشت PMI (۳۸) حاوی هورمون BAP (Merck, CAS 1214-39-7) در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر و Fe-EDDHA در چهار غلظت صـفر، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شـدند. مریسـتم‌ها شامل دو برگ پریموردیا از شـاخه‌های درون‌شیشـه‌ای گلابی جدا شدند و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و GA_3 (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، Merck, CAS 77-06-5) به‌اضـافه غلظت ثابت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر از IBA (Merck, CAS 133-32-4) کشـت شدند. مریستم‌های کشت شده برای ۴ روز در تاریکی قرار داده شـدند و بعد از آن به شـرایط نرمال اتاقک رشـد منتقل گردیدند.

ریشه‌دهی (آزمایش سوم)

شـاخه‌های درون‌شیشه‌ای پرآوری شده (بزرگتر از ۳ سانتی‌متر) در محیط کشـت PMI حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-EDDHA برای آزمایش ریشـه‌دهی مورد اسـتفاده قرار گرفتند. غلظت‌ها و ترکیبات مختلف از دو اکسین IBA و NAA مورد بررسـی قرار گرفت. تیمارها شامل غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از IBA و یـا NAA و دو تیمـار ترکیبی IBA۱۰۰۰ +NAA۱۰۰۰ و IBA۲۰۰۰ + NAA۲۰۰۰ بـود. ریزشـاخه‌ها به مدت ۵ ثانیه در محلول ریشـه‌زایی فرو برده شـدند و سپس به محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های‌رشد گیاهی منتقل شدند. سـطح مقطع ریزشاخه‌ها قبل از فرو بردن در محلول ریشه‌زایی با تیغ اسکالپل تیز بطور عمودی برش داده شدند.

در تمامی آزمایشـات pH محیط کشـت قبل از اضـافه کردن آگار (Merck, CAS 9002-18-0، ۸ گرم بر لیتر) در حـدود ۵/۷±۰/۱ تنظیم شـد. سـاکارز (Merck, CAS 57-50-1) به مقدار ۳۰ گرم بر لیتر اسـتفاده گردید. BAP و IBA از طریق اتوکلاو و GA_3 توسـط فیلتر سـرنگی (MS® MCE syringe filter, 0.22 μm) اسـتریل شـدند. شـرایط اتاقک رشـد ۲±۲۴ درجه سـانتی‌گراد و ۱۶/۸ ساعت تاریکی/روشـنایی در شـدت نور ۴۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه تامین شده توسط لامپ‌های فلورسنت سفید بود.

ثبت داده و آنالیز آماری

تعداد شـاخه پرآوری‌شـده و طول آن‌ها، تعداد برگ، نکروزه شدن نوک شـاخه و رشـد رویشـی (تعداد شـاخه پرآوری شـده×طول شاخه پرآوری شـده) برای بهبود پرآوری شـاخه‌ها، درصـد مریسـتم‌های

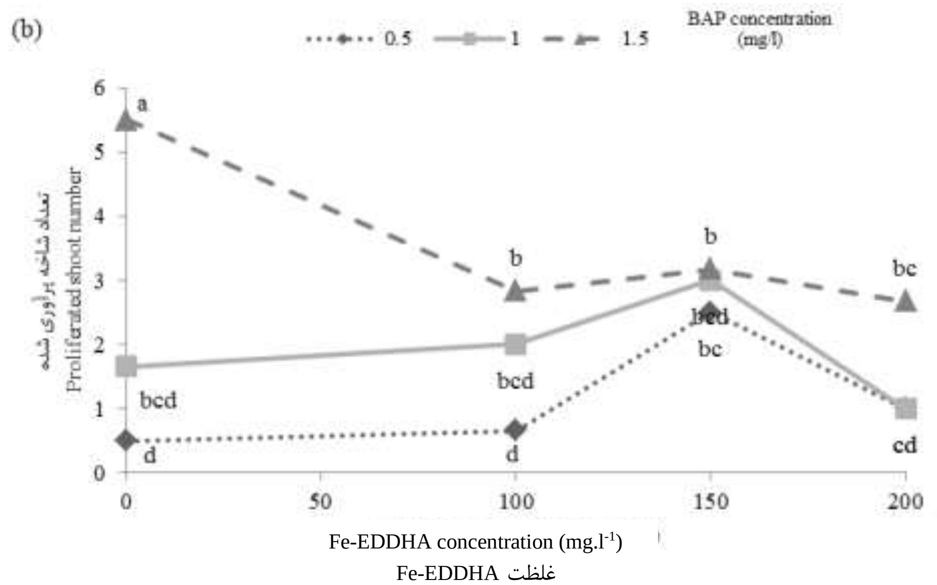
استقراریافته برای کشت مریستم و درصد ریشه‌دهی برای آزمایش ریشه‌زایی بعد از ۴ هفته از شروع هر آزمایش ثبت گردید.

تمام آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با پنج تکرار به اجرا در آمد. BAP (۳ سطح) و Fe-EDDHA (۴ سطح) برای آزمایش اول، BAP (۳ سطح) و GA_3 (۲ سطح) برای آمایش دوم بصورت فاکتوریل آنالیز شدند. از نرم‌افزار SAS (۴۴) برای آنالیز آماری استفاده گردید و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

پرآوری شاخه (آزمایش اول)

تعداد شاخه پرآوری شده یکی از مهم‌ترین فاکتورهای اقتصادی در ریزازدیادی است. تعداد شاخه پرآوری شده تحت تاثیر غلظت‌های مختلف BAP ($p \leq ۰/۰۱$) و Fe-EDDHA ($p \leq ۰/۰۵$) و اثر متقابل آن‌ها ($p \leq ۰/۰۵$) قرار گرفت. بالاترین میزان شاخه پرآوری شده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP (۳/۵۴؛ شکل ۱، a)، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-EDDHA (۲/۸۹؛ شکل ۱، a) و ۱/۵میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-EDDHA (۵/۵۰؛ شکل ۱، b) مشاهده شد. ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-EDDHA تاثیر تعادلی معنی‌داری برای تمام سطوح BAP داشت که نشان می‌هد ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر غلظت بهینه Fe-EDDHA برای پرآوری شاخه گلابی نطنز می‌باشد (شکل ۱، b). تعداد شاخه پرآوری شده گلابی با افزایش غلظت BAP افزایش می‌یابد (۴۶). برای پایه‌های مختلف گلابی غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP برای پرآوری شاخه مناسب بود (۲۸). اثر مثبت Fe-EDDHA بر نرخ تکثیر *Rubus* (۵۸)، بلوبری رقم (۱۴ و ۶۰) و پایه گلابی OHF 333 (۴۹) قبلاً گزارش شده‌است. تسائو و رید (۵۸) گزارش کردند که برگ‌های *Rubus* شاخه‌های جانبی بیشتری را تولید کردند زمانی‌که ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-NaEDTA به محیط اضافه شد. Fe-EDDHA در بلوبری باعث ایجاد رنگ سبز تیره در برگ و شاخه‌های رقم Blue Crop شد و نرخ تکثیر گیاه را افزایش داد (۱۴).



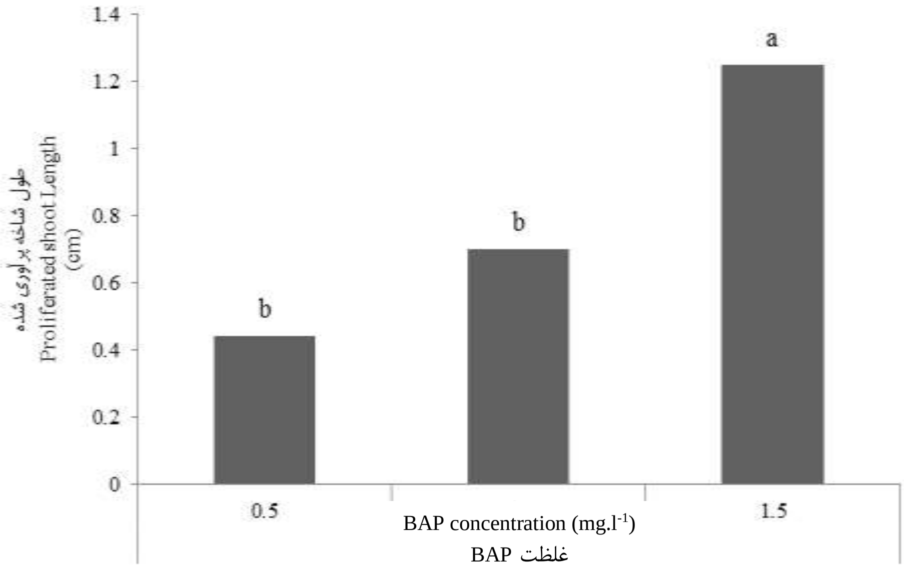
شکل ۱- تعداد شاخه‌های پرآوری شده *Pyrus communis* cv. Natanz تحت تاثیر غلظت‌های مختلف BAP، Fe-EDDHA (a) و اثر متقابل BAP×Fe-EDDHA (b) در شرایط درون‌شیشه‌ای

Figure 1- The effect of BAP and Fe-EDDHA concentrations (a) and BAP×Fe-EDDHA interaction (b) on *in vitro* proliferated shoot number of *Pyrus communis* cv. Natanz. (LSD, *p≤0.05*)

طول شاخه پرآوری شده

BAP ($p \leq ۰/۰۱$) تاثیر معنی‌داری بر طول شاخه پرآوری شده داشت درحالی‌که Fe-EDDHA فاکتور موثری نبود. طویل‌ترین شاخه پرآوری شده در محیط کشت غنی شده با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP (۱/۲۵ سانتی‌متر) و کوتاه‌ترین در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP (۰/۴۴۲ سانتی‌متر) مشاهده شد (شکل ۲). حسانن و گبر (۲۰) بیشترین مقادیر طول شاخه پرآوری شده *Pyrus betulaefolia* را در سطوح بالای BAP گزارش کردند. هک و کالو (۱۸) نیز شاخه‌های پرآوری شده بلندتری را در مقادیر بالای BAP بدست آوردند. در مقابل، شیبلی و همکاران (۴۸) برای گلابی وحشی *Pyrus*

syrica و تاکور و کانوار (۵۶) برای گلابی *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai.I بیان کردند که سطوح بالای BAP طول شاخه‌های پرآوری شده را کاهش داد. غلظت‌های BAP تاثیرات متغیری در طول شاخه‌های پرآوری شده *Pyrus communis* L. cv. Sebri نشان داد زمانی‌که با سایر تنظیم کننده‌های رشدی IBA و GA_3 بکار برده شد (۲۳).



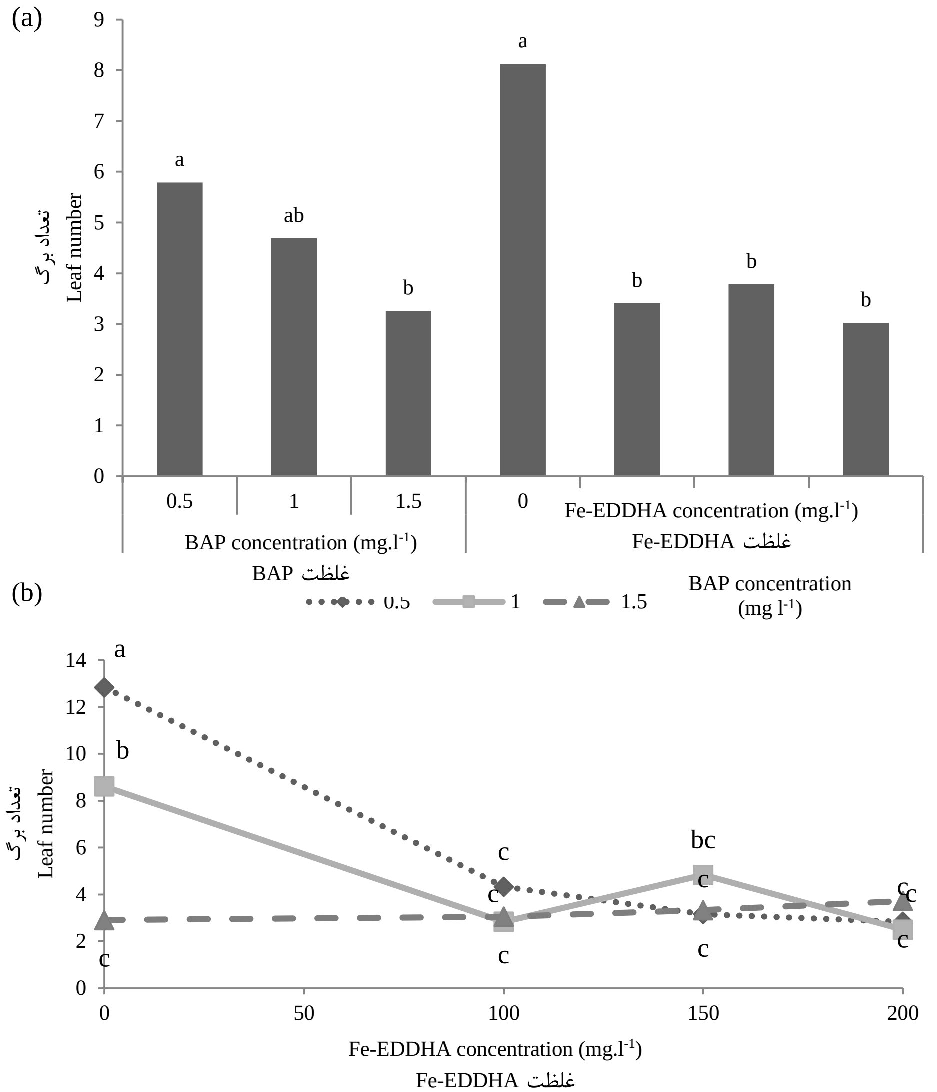
شکل ۲- طول شاخه‌های پرآوری شده *Pyrus communis* cv. Natanz تحت تاثیر غلظت‌های مختلف BAP در شرایط درون‌شیشه‌ای
Figure 2- *Pyrus communis* cv. Natanz proliferated shoot length affected by BAP concentrations *in vitro*. (LSD, $p\leq 0.05$)

تعداد برگ تولید شده

سطوح مختلف BAP ($p\leq$۰/۰۵)، Fe-EDDHA ($p\leq$۰/۰۱) و اثر متقابل BAP×Fe-EDDHA ($p\leq$۰/۰۱) تاثیر معنی‌داری بر برگ تولید شده داشت بطوری‌که غلظت‌های بالاتر BAP باعث تولید برگ‌های بالغ بیشتری (۵/۷۹) شد. فقدان Fe-EDDHA (۵/۷۹) نسبت به حضور آن در غلظت‌های ۱۰۰–۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای تولید برگ بالغ بهتر بود. محیط کشت‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بدون Fe-EDDHA (۱۲/۸۳) منجر به تولید بالاترین تعداد برگ بالغ به ازای هر شاخه شد (شکل ۳). شاخه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم برلیتر BAP + ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-EDDHA برگ‌هایی با تعداد مناسب (۳/۱۶) و کیفیت بهتر تولید کردند.

نکروزه شدن نوک شاخه

قهوه‌ای شدن نوک شاخه مانند علائم کمبود عناصر غذایی کم تحرک مانند کلسیم می‌باشد (۲۵) و می‌تواند به آبشاری از عوامل موثر بر سطوح کلسیم و بور در محیط کشت وابسته باشد (۵). بایرو و همکاران (۵) دریافتند که کالوس در پای شاخه می‌تواند به عنوان یک مخزن برای برخی اجزای محیط کشت مانند کلسیم که مسئول قهوه‌ای شدن نوک شاخه هستند عمل کند. سایتوکنین‌ها نقشی را در تنظیم غالبیت انتهایی و انتقال سیگنال‌ها بر عهده دارند (۳۱ و ۴۳) و هر گونه بی نظمی در عمل و در دسترس بودن سیتوکنین‌ها، به احتمال زیاد باعث اختلال در تعادل مواد مغذی کل گیاه می‌شود. نکروزه شدن نوک شاخه در تمام محیط کشت‌های حاوی BAP با شدت‌های مختلف مشاهده شد ($p\leq$۰/۰۵). BAP در ۱/۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب بیشترین تا کمترین میزان نکروزه شدن نوک شاخه را نشان داد (شکل ۴). Fe-EDDHA هیچ تاثیری بر نکروز شدن نوک شاخه نداشت. تاکور و کانوار (۵۷) بیان کردند که غلظت‌های بالای BAP منجر به نکروزه شدن بیشتر شاخه برخی ارقام گلابی شد در حالی‌که شاخه‌های گلابی وحشی نکروزه شدن را نشان ندادند.



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های BAP و Fe-EDDHA (a) و اثرات متقابل BAP×Fe-EDDHA (b) بر تعداد برگ تولید شده در ریزشاخه‌های *Pyrus communis* cv. Natanz

Figure 3- The effect of BAP and Fe-EDDHA concentrations (a) and BAP×Fe-EDDHA interaction (b) on *in vitro* leaf number production of *Pyrus communis* cv. Natanz. (LSD, $p \leq 0.05$)

در مقابل گریگوریادو و همکاران (۱۵) بیان کردند که BAP تاثیری بر میزان قهوه‌ای شدن نوک شاخه در *P. communis* نداشت. همچنین گزارش شده است که طول مدت واکشت بر میزان قهوه‌ای شدن شاخه موثر بوده و واکشت زودتر میزان آن را کاهش می‌دهد که ممکن است بدلیل تقلیل نمک‌ها و یا سایر مواد در محیط کشت در طول دوره کشت باشد (۵۷ و ۱۵). در سایر گیاهان مانند *Quercus rubur* (۳۳)، *H. procumbens* (۴) و *Cercis canadensis* var. Mexicana (۲۷) نیز افزایش قهوه‌ای شدن نوک شاخه در غلظت‌های بالای سایتوکنین مشاهده شد.

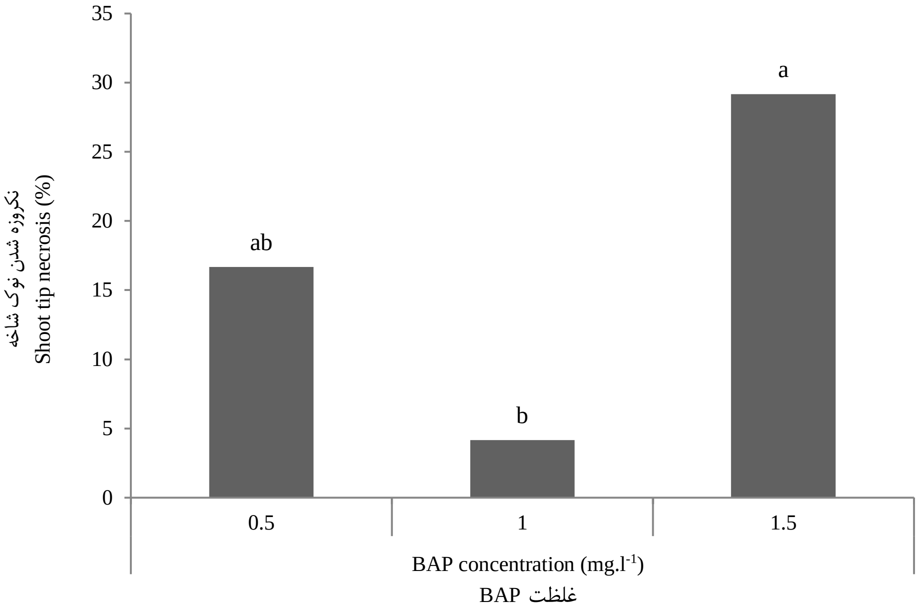
رشد رویشی

رشد رویشی به عنوان یک شاخص از قدرت محیط کشت در القای رشد رویشی (حاصل میانگین طول شاخه پرآوری شده ضرب‌در تعداد شاخه پرآوری شده+ طول شاخه اصلی) در این آزمایش تحت تاثیر سطوح مختلف BAP ($p \leq$ ۰/۰۱)، Fe-EDDHA ($p \leq$ ۰/۰۵) و اثر متقابل BAP×Fe-EDDHA ($p \leq$ ۰/۰۵) قرار گرفت. بهترین ترکیب متقابل برای رشد رویشی در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم برلیتر BAP + ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-EDDHA بدست آمد

(شـکل ۶، a). طول شـاخه اصلی تحت تاثیر فاکتورهای مورد بررسی قرار نگرفت. رشد شاخه‌های مقاوم به سرمای سیب (B.9، Otawa.3، P.2 و P.22) زمـانی‌که Fe-EDDHA بجای Fe-EDTA به عنوان منبع آهن جـایگزین شــد مطلوب بود (۶۲). قدرت رشـــدی گیاه در شـاخه‌های بلوبری رقم Blue Crop با کاربرد Fe-EDDHA افزایش یافت (۱۴).

کشت مریستم (آزمایش دوم)

غلظت BAP تاثیر معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۱$) بر زنده‌مانی مریســـتم داشـــت درحـالی‌که غلظت GA_3 بی‌تاثیر بود. مریســـتم‌ها بخوبی در محیط کشـــتی حـاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر GA_3 (۸۱ درصــد) بصــورت طبیعی اســتقرار یافتند. بعد از آن مریســـتم‌ها در محیط غنی شــــده با ۱ میلی‌گرم برلیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 نیز درصـد خوبی از اسـتقرار را نشان دادند (۶۳ درصــد، جدول ۱). اریک و فورتس (۱۲) مریســـتم ارقام ‘Carrick’ ‘Garber’ گلابی را در ترکیب تنظیم کننده رشدی BAP (۱ میلی‌گرم بر لیتر)، NAA (۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر) و GA_3 (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) بخوبی مستقر کردند.



شکل ۴- نکروزه شدن نوک شاخه در ریزشاخه‌های *Pyrus communis* cv. Natanz تحت تاثیر غلظت‌های BAP در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 4- *Pyrus communis* cv. Natanz shoot tip necrosis affected by BAP concentrations *in vitro*. (LSD, $p \leq 0.05$)

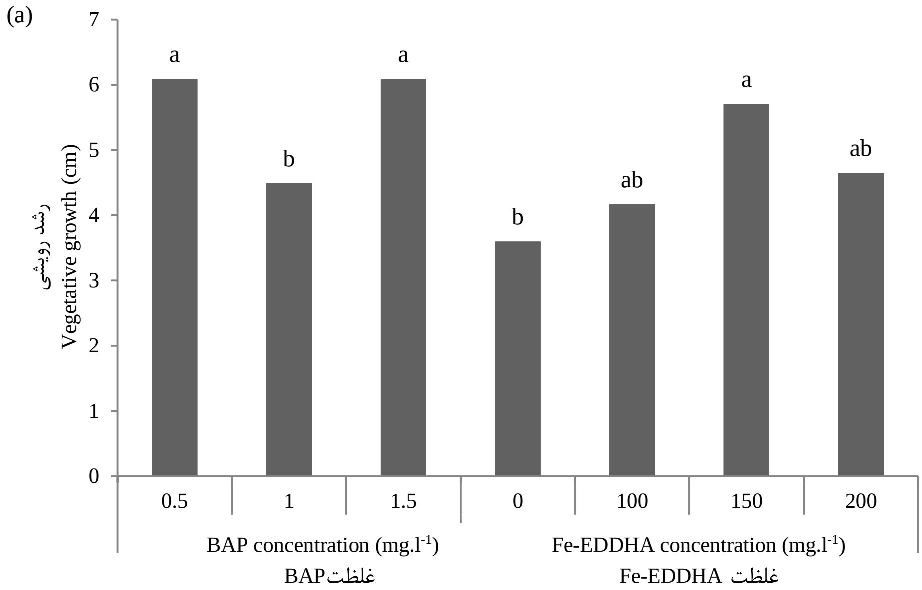
جدول ۱- اثرات ساده و متقابل غلظت BAP و GA_3 بر زنده‌مانی گیاهان (درصد) حاصل از کشت مریستم *Pyrus communis* cv. Natanz در شرایط درون‌شیشه‌ای

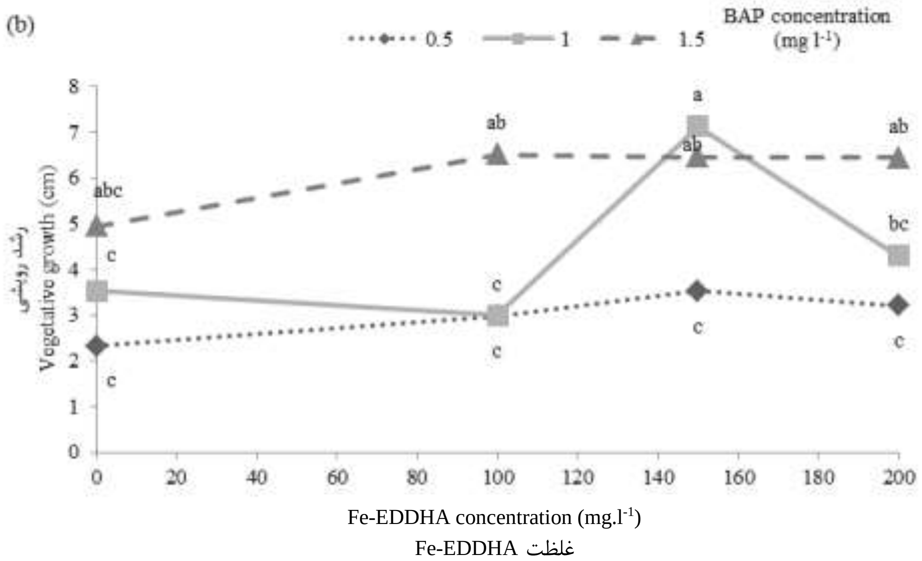
Table 1- The simple and interaction effects of BAP and GA_3 concentrations on survival plants (%) of *Pyrus communis* cv. Natanz meristems *in vitro*

		غلظت BAP BAP concentration (mg.l^{-1})			
		0.5	1	1.5	
غلظت GA_3 GA_3 concentration (mg.l^{-1})	0.1	36.00 ab	63.00 a	0.00 b	33.00 A
	0.5	81.00 a	0.00 b	0.00 b	27.00 A
		58.50 A	31.50 AB	0.00 B	

میانگین‌های دارای حروف مشترک (حروف بزرگ اثرات ساده و حروف کوچک اثرات متقابل) تفاوت معنی‌داری با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Means with similar letters (capital for simple and small for interaction effects) have no significant differences based on LSD test at $p \leq 0.05$.





شکل ۵- تاثیر غلظت‌های BAP و Fe-EDDHA (الف) و اثر متقابل BAP×Fe-EDDHA (ب) بر رشد رویشی ریزشاخه‌های *Pyrus communis* cv. Natanz در شرایط درون‌شیشه‌ای

Figure 5- The effect of BAP and Fe-EDDHA concentrations (a) and BAP×Fe-EDDHA interaction (b) on *in vitro* vegetative growth of *Pyrus communis* cv. Natanz. (LSD, $p\leq0.05$)

ریشه دهی (آزمایش سوم)

اکسین تنها در مراحل اولیه فرآیند ریشه‌دهی برای القای ریشه‌های نابجا مورد نیاز است (۱ و ۱۹). در مراحل بعدی توسعه ریشه اکسین می‌تواند حتی توسعه ریشه را باز دارد (۹، ۱۱، ۲۲ و ۲۶). اغلب روش‌های ریشه‌دهی درون شیشه‌ای منتشر شده از روش دو مرحله‌ای ریشه‌دهی می‌باشد که القای ریشه در مرحله اول و طویل شدن ریشه در مرحله دوم رخ می‌دهد. انواع مختلف اکسین و غلظت‌های آن‌ها تاثیر معنی‌داری روی ریشه‌دهی ریزشاخه‌های گلابی نطنز داشت ($p\leq۰/۰۵$). NAA ریشه‌دهی را در غلظت‌ها پایین‌تر القا کرد درحالی‌که تاثیر مثبت IBA در ریشه‌دهی در غلظت‌های بالاتر مشاهده شد (جدول ۲). ۱۰۰ درصد از ریزشاخه‌ها در غلظت‌های ۱۰۰۰ تا ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر NAA و همچنین تیمار ترکیبی ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر کدام از NAA و IBA ریشه دادند (شکل ۶ c). تاثیرات مختلف انواع اکسین بر ریشه‌دهی گلابی در گلابی وحشی (۴۸)، پایه *Pyrus betulaefolia* (۲۰)، برخی ارقام گلابی (۵۸) و *Pyrus elaeagrifolia* Pallas (۳) گزارش شده‌است.

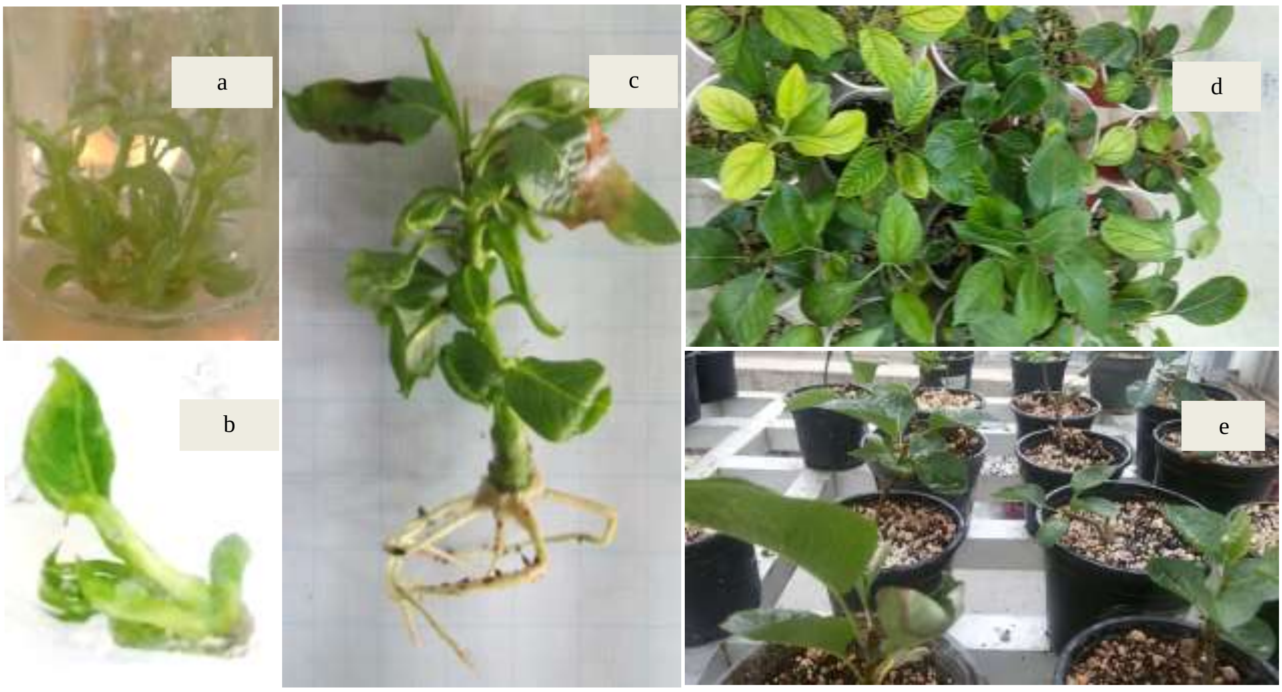
جدول ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف IBA و NAA بر ریشه‌دهی درون‌شیشه‌ای ریزشاخه‌های *Pyrus communis* cv. Natanz

Table 2- The effect of different concentrations of IBA and NAA on rooting of *Pyrus communis* cv. Natanz micro-shoots *in vitro*

IBA	NAA	Rooting ریشه‌دهی
(mg.l-1)		(%)
1000	-	00.00 b
2000	-	33.34 ab
3000	-	66.67 ab
4000	-	66.67 ab
-	1000	66.67 ab
-	2000	100 a
-	3000	100 a
-	4000	100 a
1000	1000	100 a
2000	2000	100 a

میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Means with similar letters have no significant differences based on LSD test at $p\leq 0.05$.



شکل ۶- *Pyrus communis* cv. Natanz در مراحل مختلف ازدیاد درون شیشه‌ای: a) پرآوری شاخه در محیط کشت PMI حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر Fe-EDDHA؛ b) مریستم استقرار یافته در محیط کشت MS حاوی ۰/۵میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بعد از ۴ هفته از کشت؛ c) شاخه‌های ریشه‌دار شده توسط فروبری سریع در محلول ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیترNAA ؛ d و e) به ترتیب، گیاهچه‌های گلابی نطنز بعد از ۶ هفته (آزمایشگاه) و ۳ ماه (گلخانه) از سازگاری

Figure 6- *Pyrus communis* cv. Natanz in different stages of *in vitro* propagation: a) shoot proliferation in BAP at 1 mg.l-1 + Fe-EDDHA at 150 mg.l-1, b) established meristem in medium containing BAP at 0.5 mg.l-1 + GA_3 at 0.5 mg.l-1 + IBA at 0.1 mg.l-1 after 4 weeks, c) Rooted shoot induced by 1000 mg.l-1 IBA+ 1000 mg.l-1 NAA, d and e) Natanz plantlets after 6 weeks (in the laboratory) and tree months (in the greenhouse) of adaptation, respectively.

رید و همکاران (۴۰) در پروتکل ریزازدیادی گلابی بیان کردند که اکثر ارقام گلابی با استفاده از روش فروبری سریع در محلول ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر IBA یا NAA و سپس انتقال به محیط کشت بدون تنظیم کننده رشد ریشه می‌دهند. فروبری سریع شاخه‌های در محلول ۷۵۰ میکرومولار IBA ریشه‌دهی رقم 'Delicious' را از ۶۰ درصد به ۷۹ درصد افزایش داد (۵۱). منصوریار و همکاران (۲۸) ابتدا ریزشاخه‌های چند پایه گلابی را در محیط کشت QL حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در تاریکی به مدت ۸ روز قرار دادند سپس برای بیان ریشه در محیط کشت بدون هورمون منتقل کردند و به ۷۷ تا ۱۰۰ درصد ریشه‌دهی رسیدند. کریم‌پور و همکاران (۲۴) با کاربرد غلظت‌های IBA و NAA در محیط کشت القای ریشه نتوانستند گیاهچه ریشه‌دار گلابی نطنز تولید کنند اما در تیمار زخم‌زنی و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA در محیط کشت القای ریشه، درصد پایینی ریشه‌دهی (۱۲/۵۶ درصد) مشاهده کردند. صفرنژاد و همکاران (۴۲) در ریشه‌زایی گلابی رقم نطنز با کاربرد ۱ تا ۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA در محیط ریشه‌زایی توانستند حداکثر ۵۵ درصد ریشه‌زایی را مشاهده کنند. گیاهچه‌های تولید شده به خوبی به شرایط محیطی سازگار شدند (شکل ۶، d و e).

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تأمین اعتبار این پژوهش سپاسگزاری نمایند.

منابع

1. Abel S., and Theologis A. 1996. Early genes and auxin action. Plant Physiology 111: 9-17.
2. Al-Maarri K., Arnaud Y., and Miginiac E. 1994. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar 'Passe Crassane' seedlings and cultivar 'Williams': factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. Scientia Horticulturae 58: 207-214.
3. Aygun A., and Dumanoglu H. 2015. *In vitro* shoot proliferation and *in vitro* and *ex vitro* root formation of *Pyrus elaeagrifolia* Pallas. Frontiers in Plant Science 6: 1-9.
4. Bairu M.W., Jain N., Stirk W.A., Dolezal K., and Staden J.V. 2009a. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* bychanging the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. South African Journal of Botany 75: 122-127.
5. Bairu M.W., Stirk W.A., and Staden J.A. 2009b. Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 98: 239-248.
6. Bell R.L., and Reed B.M. 2002. *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. Proc.8th IS on Pear, Eds. L. Corelli-Grappadelli *et al*. Acta Horticulturae 596: 412-418.
7. Bhojwani S.S., Mullins K., and Cohen D. 1984. *In vitro* propagation of *Pyrus pyrifolia*. Scientia Horticulturae 23: 247-254.
8. Clapa D., Fira A., and Rusu T. 2007. The use of isubgol and sequestrene 138 for the *in vitro* propagation of the highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Journal of Food, Agriculture & Environment 6(1): 132-134.
9. De Klerk G.J., Van Der Krieken W., and De Jong J.C. 1999. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 35:189-99.
10. Dong Y., Zhang Z., Zhamg S.H., Hong N., and Yu, J. 2002. Studies on elimination of apple and pear virus by combining tissue culture of top-stem with heat therapy. Northern Fruits 2.
11. Druart P. 1997. Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. Biologia Plantarum 39: 67-77.
12. Erig A.C., and Fortes G.R.L. 2002. *In vitro* establishment of pear (*Pyrus* spp.) starting from meristems and buds. Ciência Rural 32(4): 577-582.
13. Erturk U. 2013. The *in vitro* rooting performance of pear rootstock 'OHx×F 333' in different rooting Procedures. Journal of Food, Agriculture & Environment 11(3&4): 1424-1427.
14. Fira A., Clapa D., and Badescu C. 2008. Aspects regarding the *in vitro* propagation of highbush blueberry cultivar Blue crop. Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary 65(1): 104-109.
15. Grigoriadou K., Leventakis N., Vasilakakis M. 2000. Effect of various culture conditions on proliferation and shoot-tip necrosis in the pear cultivars 'William's' and 'Highland' grown *in vitro*. Acta Horticulturae 520: 103-108.

16. Haghgou Tabalvandi M., Yadollahi A., Atashkar D., Kalatejari S. and Eftekhari M. 2014. Optimized root production during micropropagation of new Iranian apple hybrid rootstock (AZ×M9): effects of Fe-EDDHA and thiamine. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research 2(10): 2659-2662.
17. Hakkaart F.A., and Versluijs J.M.A. 1988. Virus elimination by meristem-tip culture from a range of Alstroemeria cultivars. Netherlands Journal of Plant Pathology 94: 49-56.
18. Haq Z., and Kaloo Z.A. 2010. *In vitro* micro propagation of "sand pear" *Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai. Frontiers of Agriculture in China 4(3): 358–361.
19. Harbage J.F., Stimart D.P., and Evert R.F. 1993. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. Journal of the American Society for Horticultural Science 118: 680-8.
20. Hassanen S.A., and Gabr M.F. 2012. *In vitro* propagation of Pear *Pyrus betulaefolia* rootstock. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 12(4): 484-489.
21. Hong Z.H., Hong N., and Wang G. 2004. Pear meristem culture and its application in pear virus eliminations. Journal of Huazhong Agricultural 3.
22. James D.J., Thurbon I.J. 1979. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M.9. Journal of Horticultural Science 54: 309-11.
23. Karimpour S, Davarynejad G.H., Bagheri A., and Tehranifar A. 2013. *In vitro* establishment and clonal propagation of Sebri pear cultivar. Journal of Agricultural Science and Technology 15: 1209-1217.
24. Karimpour S., Davarynejad G.H., Bagheri A.,Tehranifar A., Ardakani E., and Vatandoost-Jartoode, S. 2012. IBA and wounding effect on *in vitro* rooting of Natanz pear cultivar. 3rd Iranian Agricultural Biotechnology Congress. p. 255. 3-5 September, Mashhad, Iran. (In Farsi with English abstract)
25. Kintzios S., Stravropoulous E.R., and Skamneli S. 2004. Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). Plant Science 167: 655-664.
26. Lane WD. 1978. Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips. Plant Science Letters 13: 281-5.
27. Mackay W.A., Tipton J.L., and Thompson G.A. 1995. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. mexicana. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43: 295-299.
28. Mansouryar M., Erfani-Moghadam J., Abdollahi H., and Salami SA. 2016. Optimization of *in vitro* micropropagation protocol for some vigorous rootstocks of pear. Iranian Journal of Horticultural Science 47 (2): 361-370.
29. Marino G. 1988. The effect of paclobutrazol on *in vitro* rooting, transplant establishment and growth of fruit plants. Plant Growth Regulation 7: 237-247.
30. Niino T., and Sakai A. 1992. Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. Plant Science 87: 199-206.
31. Ongaro V., and Leyser O. 2008. Hormonal control of shoot branching. Journal of Experimental Botany 59: 67–74.
32. Pardaz J.E., Ojagh S., and H.D. Kazemnia. 2015. Effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on meristem establishment and *in vitro* organogenesis of Iranian pear (*Pyrus glabra*). International Journal of Agriculture and Biosciences 4(5): 206-208.
33. Pierik R.L.M., Oosterkamp J., Manschot G.A.J., and Barth T. 1997. Basic factors affecting initiation and growth of adult *Quercus rubur* Fastigiata *in vitro*. COST 822: 4th Meeting of the working group 3 on 'Identification and control of phase changes in rejuvenation', Nitra, Slovak Republic, 15-19 October, (original not seen cited by Grigoriadou et al. [2000] Acta Horticulturae 520: 103-108).
34. Postman J. D. 1994. Elimination of viruses from clonal pear germplasm. Acta Horticulture 367: 72-75.
35. Postman J. D., and Hadidi, A. 1995. Elimination of apple scar skin viroid from pears by *in vitro* thermotherapy and apical meristem culture. Acta Horticulture 386: 536-543.
36. Postman J.D., and Sugar, D. 2002. Elimination of viruses from the USDA *Pyrus* germplasm collection. Proc.8th IS on Pear. Eds. L. Corelli-Grappadelli *et al*. Acta Horticulture 596: 529-530.
37. Reed B.M. 1990. Survival of *in vitro*-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. HortScience 25(1): 111-113.
38. Reed M.B., De Noma J., Wada S., and Postman J. 2013. Micropropagation of Pear (*Pyrus* sp.). Maurizio Lambardi *et al*. (eds.), Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology 994: 3-18.
39. Rugini E., Jacoboni A., and Luppino M. 1992. Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species. Scientia Horticuiturae

53: 63-72.
40. Saadat Y.A., Jokar L. and Sayyah Jahromi L. 2012. *In vitro* rooting of *Pyrus glabra* Boiss. Microshoots. Iranian Journal of Natural Resources Research 1: 46-51.
41. Sadeghi F., Yadollahi A., Jafarkhani Kermani M., and Eftekhari M. 2015. Optimizing culture media for *in vitro* proliferation and rooting of Tetra (*Prunus empyrean* 3) rootstock. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 13(1): 19-23.
42. Safarnejad A., Bibi S., Alamdari L., Darroudi H., and Dalir M. 2016. The effect of growth regulators (BAP and IBA) on regeneration, proliferation and rooting of Natanz pears plant using *in vitro* technique. Iranian Journal of Plant Biology 8(29): 77-90. (In Persian with English abstract)
43. Sakakibara, H. 2004. Cytokinin biosynthesis and metabolism, In: Davies, P.J. (Ed.), Plant Hormones: Biosynthesis, Signal transduction, Action, 3rd ed. Kluwer Academic Publishers, London, 95–114.
44. SAS Institute Inc. 1989. SAS/STAT User's Guide, Version 6. 4th Edition, Volume 2. SAS Institute, Inc., Cary.
45. Scottez C., Chevreau E., Godard N., Arnaud, P., Duron M., and Dereuddre J. 1992. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear *in vitro* cultures after encapsulation-dehydration. Cyrobiology 29: 691-700.
46. Sedlák J., and Paprštein F. 2015. *In vitro* propagation and rooting of pear cultivars. Proc. VIIIth IS on *In vitro* Culture and Horticultural Breeding. Acta Horticulture 1083: 157-162.
47. Sedlak J., Paprstein F., Bilavcik A., and Zamecnik J. 2004. *In vitro* cultures and cryoperservation as a tool for conserving of fruit species. Bulletin of Botanical Gardens 13: 65–67.
48. Shibli R.A., Ajlouni M.M., Jaradat A., Aljanabi S., and Shatnawi M. 1997. Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). Scientia Horticulturae 68: 237-242.
49. Sotiropoulos T.E., Almaliotis D., Papadakis I., Dimassi K.N. and Therios I.N. 2006. Effects of different iron sources and concentrations on *in vitro* multiplication, rooting and nutritional status of the pear rootstock 'OHF 333'. European Journal of Horticultural Science 71(5): 222-226.
50. Spornberger A., Brunmayer R., Fischer G., Kaufmann C., and Osterc G. 2008. Testing of pear trees on their own roots in comparison with important used rootstocks under organic farming conditions with special regard to fire blight. 13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing, Weinsberg, 18-20.
51. Sriskandarajah S., Mullins M.G., and Nair Y. 1982. Induction of adventitious rooting in vitro in difficult-to-propagate cultivars of apple. Plant Science Letters, 24:1–9.
52. Stanica F., Dumitrascu M., and Peticila A. 2000. Behavior of three pear varieties propagated "*in vitro*" and self-rooted on *Tatura trellis* canopy. Proceedings of the ISHS- 8th International Pear Symposium, Ferrara-Bologna, Italy 4.-9.9.2000, 202-203.
53. Sun Q., Sun H., Bell R., and Xin L. 2009. Effect of polyvinyl alcohol on *in vitro* rooting capacity of shoots in pear clones (*Pyrus communis* L.) of different ploidy. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 99: 299–304.
54. Taiz L., and Zeiger E. 1991. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publ. Co., Inc. Redwood City, Calif., USA. 565 p.
55. Tan R., Wang L., Hong N., and Wang G. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101: 229–235.
56. Thakur A., and Kanwar J.S. 2011. Effect of phase of medium, growth regulators and nutrient supplementations on *in vitro* shoot-tip necrosis in pear. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 39(2): 131-140.
57. Thakur A., and Kanwar J.S. 2008. Micropropagation of 'wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai.I. explant establishment and shoot multiplication. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 36(1): 103-108.
58. Tsao W.V., and Reed B.M. 2002. Gelling agents, silver nitrate, and sequestrene iron influence adventitious shoot and callus formation from Rubus leaves. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 38: 29-32.
59. Vatandoost Jartodeh S., Davarynejad G.H., Tehranifar A., and Kaveh H. 2011. Effect of Auxin Treatments and Cuttings on Rooting of Cuttings of Natanz, Sabri and Sugar Pears. Journal of Horticultural Science 25(1): 38-44.
60. Vescan L.A., Pamfil D., Clapa A., Fira C.R. Sisea I.F., Pop I.V., Petricele O. Ciuzan, and Pop R. 2012. Efficient micropropagation protocol for highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. 'Elliot'. Romanian Biotechnological Letters 17(1): 6893-6902.
61. Wang L., Wang G., Hong N., Tang R., and Deng X. 2006. Effect of thermotherapy on elimination of apple stem grooving virus and apple chlorotic leaf spot virus for *in vitro*-cultured pear shoot tips. Hortscience 41(3): 729-732.
62. Webster C.A, and Jones O.P. 1991. Micropropagation of some cold hardy dwarfing rootstocks for apple. Journal of

Horticultural Science 66: 1-6.

63. Zilka S., Faingersh E., Rotbaum A., and Malca N. 2002. *In vitro* Production of Virus-Free Pear Plants. Acta Horticulturae 596: 477-479.

Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.3, Fall 2021, P. 341-354
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، ص. ۳۵۴-۳۴۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

In Vitro Production of Own-Root *Pyrus communis* L. cv. Natanz

G.H. Davarynejad[1*]– S. Karimpour[2]
Received: 17-06-2018
Accepted: 30-07-2019

Introduction: *Pyrus communis* L. cv. Natanz is a popular pear cultivar in Iran because of its customer-friendly attribute due to its excellent characteristics. Pear own-rooted plants has better traits such as high vigorous in growth, low levels on tree losses and damaging by insects rather than grafted plants. Meristem culture widely used for micropropagation, *in vitro* germplasm preservation, and virus eradication purposes in pear. As pear is belonged to difficult-to-root fruit tree cultivars perhaps the rooting stage is the most important stage in propagation process, yet most difficult phase during the *in vitro* propagation procedure. *In vitro* rooting of micro-cuts was varied by genotypes (cultivars), type and concentration of auxin, the method of root induction and formation, different additional materials such as PVP, polyamines, and so on. This study was aimed to investigate the effect of different levels of BAP and Fe-EDDHA on shoot proliferation, BAP and GA_3 on meristem establishment, and IBA and NAA on micro-cut rooting of pear cv. Natanz in *in vitro* condition.

Materials and Methods: Vegetative buds were taken from current growth shoots of *Pyrus communis* cv. Natanz from Pear collection orchard (25.36 E, 58.54 N, and ASL altitude 1380 m) of Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre of Semnan Province (Shahrood city). In the first experiment, new shoots of active buds after 4 weeks grown in PMI medium (MS ×1.5 $CaCl_2$. $2H_2O$, KH_2PO_4 and $MgSO_4$. $7H_2O$) + 1 mg.l^{-1} BAP were transferred to PMI medium containing different levels of BAP (0.5, 1, 1.5 mg.l^{-1}) and Fe-EDDHA (0, 100, 150 and 200 mg.l^{-1}). In the second experiment, meristems (containing two newest leaf primordia) was excited from *in vitro* shoots and incubation on MS media containing BAP (0.5, 1, and 1.5 mg.l^{-1}) and GA_3 (0.1 and 0.5 mg.l^{-1}) + 0.1 mg.l^{-1} IBA. Meristems were kept in dark for 4 days then were transferred to growth chamber with photoperiod 16/8 hrs. light/dark. Different concentrations and combinations of two auxins were used for root induction of micro-cuts in third experiment. 1000, 2000, 3000, and 4000 mg.l^{-1} of IBA or NAA and two combination solutions of them (1000 IBA+1000 NAA, and 2000 IBA+2000 NAA, mg.l^{-1}). Shoots were immersing dip in solutions for 5 seconds then transfer to PGRs-free PMI medium and kept them to growth chamber. Data of all experiments were analyzed according by completely randomized design (CRD) with five replications. BAP (3 levels) and Fe-EDDHA (4 levels) for experiment 1; BAP (3 levels) and GA_3 (2 levels) for experiment 2 were considered as factorial. SAS (v. 9.1) was used for analysis and means were compared with LSD test at 5% of probability level.

Results and Discussion: Proliferated shoot number was affected by BAP ($p≤0.01$) and Fe-EDDHA ($p≤0.05$) concentrations and also interaction of them ($p≤0.05$), while BAP ($p≤0.01$) was caused elongation of proliferated shoots and Fe-EDDHA had no effect. BAP ($p≤0.05$), Fe-EDDHA ($p≤0.01$) concentrations and BAP×Fe-EDDHA ($p≤0.01$) interaction had significant effect on leaf production. Shoot tip necrosis was shown in shoots grown in all media based on BAP concentration with different intensities ($p≤0.05$). Vegetative growth was counted as a power index of medium that in our experiment was under influence of BAP concentrations ($p≤0.01$), Fe-EDDHA ($p≤0.05$) and BAP×Fe-EDDHA interaction ($p≤0.05$). Shoots were proliferated (5.50 shoot.explant^{-1}) and elongated in PMI medium containing 1.5 mg.l^{-1} BAP with no Fe-NaEDDHA while the lower concentrations of both BAP and Fe-NaEDDHA caused the higher mature leaf production. PMI media containing 1 mg.l^{-1} BAP + 150 mg.l^{-1} Fe-NaEDDHA is recommended for Natanz shoot proliferation because of the highest vegetative growth and highest quality in proliferated shoots. MS medium with 0.5 mg.l^{-1} BAP+ 0.5 mg.l^{-1} GA_3 (81%) and 1 mg.l^{-1} BAP + 0.1 mg.l^{-1} GA_3 (63%) had the highest meristem establishment, respectively. The established meristems naturally grown in medium supplement with 0.5 mg.l^{-1} BAP + 0.5 mg.l^{-1} GA_3+0.1 mg.l^{-1} IBA. Different types of auxin and their concentrations had significantly effect on Natanz pear cultivar micro-cut rooting ($p≤0.05$). NAA induced rooting in lower concentrations while IBA had positive effect on rooting with concentration increasing. Micro-cuts were rooted via quick dip in 1000+1000 mg.l^{-1} (IBA+NAA) solution followed by incubation in PMI medium. The rooted shoots well adapted to environmental condition.

Conclusion: Important steps of *in vitro* propagation of pear is optimized in this experiment. MS medium containing 0.5 mg.l^{-1} BAP+0.5 mg.l^{-1} GA_3+0.1 mg.l^{-1} IBA had suitable for meristem establishment. To produce *in vitro* healthy proliferated shoots of pear cv. Natanz using PMI medium supplement with 1 mg.l^{-1} BAP+150 mg.l^{-1}

1 and 2- Professor and Ph.D. Graduate, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: davarynej@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/jhs.2021.60797.0

Fe-NaEDDHA is recommended. Micro-cuts were rooted easily by quick immersion of the end of micro-cuts in 1000+1000 $mg.l^{-1}$ (IBA+NAA) solution for 5 seconds then incubation in PGRs-free medium.

Keywords: *In vitro* rooting, *In vitro* propagation, Meristem culture, Pear